

DAS RHEOLOGISCHE VERHALTEN
VON 2,3-DPG-ANGEREICHERTEN
ERYTHROZYTEN
NACH INKUBATION IN
AUTOLOGEM PLASMA

Elisabeth P. Zürn

Disss
München
1984



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554815_0078

AUS DER KINDERPOLIKLINIK
DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN

DIREKTOR PROF. DR. H. SPIESS

DAS RHEOLOGISCHE VERHALTEN VON 2,3-DPG-ANGEREICHERTEN ERYTHROZYTEN
NACH INKUBATION IN AUTOLOGEM PLASMA

INAUGURAL - DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE IN DER GESAMTEN MEDIZIN
AN DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN

VORGELEGT VON

ELISABETH P. ZORN

MÜNCHEN

1984

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. M. Jensen

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. H. Spiess

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 2. August 1984

1. Einleitung
 2. Die Bedeutung der Arbeit
 3. Die Aufgaben der Arbeit
 4. Die Verantwortung der Arbeit
 5. Die Freude der Arbeit
 6. Die Ehre der Arbeit
 7. Die Liebe der Arbeit
 8. Die Hingabe der Arbeit
 9. Die Opferung der Arbeit
 10. Die Selbstaufopferung der Arbeit
 11. Die Vollendung der Arbeit
 12. Die Befriedigung der Arbeit
 13. Die Erfüllung der Arbeit
 14. Die Verwirklichung der Arbeit
 15. Die Entfaltung der Arbeit
 16. Die Entfaltung der Persönlichkeit
 17. Die Entfaltung der Talente
 18. Die Entfaltung der Kräfte
 19. Die Entfaltung der Sinne
 20. Die Entfaltung der Seele
 21. Die Entfaltung des Geistes
 22. Die Entfaltung des Herzens
 23. Die Entfaltung des Willens
 24. Die Entfaltung des Charakters
 25. Die Entfaltung des Bewusstseins
 26. Die Entfaltung des Verstandes
 27. Die Entfaltung des Gefühls
 28. Die Entfaltung des Instinkts
 29. Die Entfaltung des Instinkts
 30. Die Entfaltung des Instinkts

FÜR INGE IN DANKBARKEIT UND LIEBE

I	EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	1- 3
II.	MATERIAL - METHODEN -VERSUCHSDURCHFÖHRUNG	4- 8
2.1.	Herstellung von 2,3-DPG-angereicherten Erythrozyten ('super cells')	4
2.2.	Bestimmung der 2,3-DPG-Konzentration in Erythrozyten	5
2.3.	Durchföhrung der Scherversuche zur Bestimmung der Verformbarkeit von Erythrozyten	6
2.4.	Bestimmung von Hämatokrit, pH und Osmolarität	8
2.5.	Statistik	8
III.	ERGEBNISSE	9-10
3.1.	Die erythrozytären 2,3-DPG-Konzentrationen unter verschiedenen Inkubationsbedingungen	9
3.2.	Die Verformbarkeit von Erythrozyten unter verschiedenen Inkubationsbedingungen	9
IV.	DISKUSSION	11-19
V.	ZUSAMMENFASSUNG	20
VI.	ABBILDUNGEN UND TABELLEN	21-33
VII.	LITERATURVERZEICHNIS	34-41

I. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

Zu den wesentlichen Aufgaben der Erythrozyten gehört der Transport von Sauerstoff (O_2), der in reversibler Bindung ohne Wertigkeitsänderung des Eisenatoms an das Häm-Eisen der Hämoglobin-Untereinheiten angelagert wird.

Die Menge des letztlich an die Gewebe abgebbaren Sauerstoffs ist abhängig von:

- a) der arteriellen O_2 -Sättigung
- b) der Hb-Konzentration
- c) der Gewebedurchblutung
- d) der O_2 -Affinität, d.h. dem O_2 -Bindungs- bzw. Abgabevermögen des Hb

Im Zusammenhang mit der Fragestellung (s.u.) interessiert besonders die O_2 -Affinität.

Die Sauerstoffsättigung des Hämoglobins hängt vom Partialdruck des Sauerstoffs ab. Der charakteristische sigmoide Verlauf der Sättigungskurve entsteht durch die kooperative Wechselwirkung zwischen den vier Häm-Untereinheiten: Bei Anlagerung der vier Sauerstoffmoleküle wird das erste nur sehr langsam, die nachfolgenden wesentlich leichter und schneller gebunden und abgegeben (Oski and Delivoria-Papadopoulos 1970, Sauer 1971).

Es gibt eine Reihe von physiologischen Faktoren, welche die Lage der O_2 -Sättigungskurve - charakterisiert durch den Halbsättigungs- O_2 -Druck (P_{50} = Sauerstoffpartialdruck bei 50 % O_2 -gesättigtem Hb, 37 °C, pH 7,4) - verändern. Anstieg der Temperatur, des pCO_2 , der H^+ -Ionenkonzentration sowie der organischen Phosphate: Adenosintriphosphat (ATP) und besonders 2,3-Diphosphoglycerat (2,3-DPG) bewirken eine Rechtsverschiebung, d.h. der O_2 -Druck wird höher bei gleicher O_2 -Sättigung und der p_{50} steigt an.

2,3-DPG liegt im Erythrozyten in etwa äquimolarer Konzentration zum Hämoglobin vor und ist neben dem pH der wichtigste Faktor zur Regulierung der Sauerstoffabgabe vom Hämoglobin an die Gewebe (Benesch and Benesch 1967, Chanutin and Curnish 1967, Oski and Delivoria-Papadopoulos 1970, Versmold et al. 1973).

2,3-DPG wird im normalen Erythrozyten in einem Nebenweg der Glykolyse aus etwa 20 % des 1,3-Diphosphoglycerats (1,3-DPG) in Gegenwart der 2,3-DPG-Mutase synthetisiert. Die restlichen 80 % des 1,3-DPG werden direkt unter Bildung von ATP zu 3-Phosphoglycerat abgebaut. 2,3-DPG wird unter Einwirkung der 2,3-DPG-Phosphatase in 3-Phosphoglycerat und anorganisches Phosphat (P_i) hydrolysiert (Abb. 1). Die Aktivität der 2,3-DPG-Phosphatase im menschlichen Erythrozyten ist ziemlich gering; die 2,3-DPG-Konzentration hängt vom Gleichgewicht der Biosynthese aus 1,3-DPG und dem Abbau zu 3-Phosphoglycerat ab.

2,3-DPG wird an das deoxygenierte Hämoglobin-Molekül gebunden, und zwar an die N-terminalen Aminogruppen und das Histidin 143 der β -Ketten (Bunn and Briehl 1970, Oski and Delivoria-Papadopoulos 1970, Perutz 1970, Harper et al. 1975). Die Bindung von 2,3-DPG stabilisiert die deoxygenierte Form von Hämoglobin. D.h. das Gleichgewicht verschiebt sich in Richtung Deoxyhämoglobin; die Bindung von Sauerstoff an das Hämoglobin wird erschwert, die Abgabe von Sauerstoff erleichtert.

Durch Erhöhung des 2,3-DPG kommt es somit zur Abnahme der O_2 -Affinität und zur Rechtsverschiebung der Sauerstoff-Dissoziationskurve. Eine geringere 2,3-DPG-Konzentration führt zur stärkeren O_2 -Bindung an das Hämoglobin und damit zur Linksverschiebung der Bindungskurve (Lenfant et al. 1968, Delivoria-Papadopoulos et al. 1969, Oski et al. 1969, Woodson et al. 1970).

Unter physiologischen und pathologischen Bedingungen kommt es in vivo zu Veränderungen der 2,3-DPG-Konzentration im Erythrozyten (Eaton and Brewer 1968, Lenfant et al. 1968, Delivoria-Papadopoulos et al. 1969, Oski et al. 1969, Valeri and Fortier 1969, Torrance and Bartlett 1970b, Woodson et al. 1970). Die 2,3-DPG-Konzentration im Erythrozyten nimmt zu, wenn infolge von Hypoxämie die Konzentration an deoxygeniertem Hämoglobin erhöht ist, so bei zyanotischen Herz- und chronischen Lungenerkrankungen (Oski et al. 1969, 1970), bei chronischen Anämien (Torrance et al. 1970a) und nach Anpassung an große Höhen (Lenfant et al. 1968). Im frühen Säuglingsalter liegt 2,3-DPG im Erythrozyten in überdurchschnittlich hoher Konzentration vor (Vermold et al. 1973).

Zwischen der 2,3-DPG-Konzentration und dem P_{50} des Blutes besteht eine enge Korrelation (Seifert 1972, Olbrich 1974). Wie aus Abb. 2 ersichtlich, besteht im Bereich zwischen 0,1 und 6 $\mu\text{mol/ml}$ 2,3-DPG eine lineare Beziehung. Oberhalb von 8 $\mu\text{mol/ml}$ flacht die Kurve etwas ab und erreicht einen P_{50} von ca. 35 mmHg bei einer 2,3-DPG-Konzentration von 12 $\mu\text{mol/ml}$ (Duhm 1971). In der zitierten Untersuchung (Duhm 1971) wurde die intraerythrozytäre 2,3-DPG-Konzentration durch Inkubation der Erythrozyten in einem speziellen Medium, welches Inosin, Pyruvat und anorganisches Phosphat enthielt (IPP-Puffer), erhöht. Solche Erythrozyten mit artefiziell über die Norm erhöhter 2,3-DPG-Konzentration werden wegen ihrer besseren Sauerstoffabgabefähigkeit 'super cells' genannt.

Es sind klinische Situationen denkbar, in denen eine erniedrigte O_2 -Affinität einen wesentlichen Beitrag zur Verbesserung der Gewebesauerstoffversorgung leisten kann, weil die anderen Kompensationsmechanismen, insbesondere die Erhöhung der Gewebedurchblutung, eingeschränkt bzw. ausgeschöpft sind (z.B. Koronarsklerose, hypoxische Myokardschädigung, Frühgeborene mit Atemnotsyndrom). (Oski and Delivoria-Papadopoulos 1970, Vermold et al. 1972, Duhm and Gerlach 1974). Damit stellt sich die Frage nach der therapeutischen Verwendbarkeit von 'super cells' und den Eigenschaften dieser Zellen.

Bevor die Wirkungen von Transfusionen von 'super cells' auf Kreislaufparameter und die Gewebesauerstoffversorgung von Patienten untersucht werden können, sollten in vitro Messungen rheologischer Eigenschaften dieser Zellen durchgeführt werden. Ist es doch vorstellbar, daß der für die Gewebesauerstoffversorgung günstige Effekt erniedrigter O_2 -Affinität wegen verminderter Fließfähigkeit von 'super cells' nicht zum Tragen kommen kann.

In einer dieser Arbeit vorausgehenden Untersuchung (Kleber 1982) zeigte sich, daß die Verformbarkeit von 'super cells', die unmittelbar im Anschluß an die Inkubation in dem relativ unphysiologischen IPP-Medium gemessen wurde, gegenüber der Verformbarkeit normaler Erythrozyten vermindert ist.

Ziel der vorliegenden Arbeit war, zu untersuchen, ob die Verschlechterung der rheologischen Eigenschaften allein aus der Zunahme von 2,3-DPG resultiert, oder auf die Inkubation als solche zurückzuführen ist. Um diese Frage zu untersuchen, wurden in IPP-Medium inkubierte und somit DPG-angereicherte und schlechter verformbare Erythrozyten anschließend in physiologischem Medium (Eigenplasma) inkubiert. Es wurde untersucht, wie sich während dieser zweiten Inkubation der 2,3-DPG-Gehalt einerseits und die Verformbarkeit andererseits verhalten.

II. MATERIAL - METHODEN - VERSUCHSDURCHFÜHRUNG

2.1. Herstellung von 2,3-DPG-angereicherten Erythrozyten ('super cells')

Aus einer peripheren Vene wurden 20 ml Blut mit einer Einmalspritze, deren Konus mit Heparin (Liquemin) gefüllt war, entnommen. Das Blut wurde in einer Heraeus-Christ-Zentrifuge (Laborfuge II) 10 Minuten bei Zimmertemperatur und 3700 U/min zentrifugiert. Das abgetrennte Plasma wurde im Kühlschrank aufbewahrt und die auf den gepackten Erythrozyten liegende Leukozytenschicht ('buffy coat') entfernt. Die abgetrennten Erythrozyten wurden zweimal in der doppelten Menge eines modifizierten Phosphat-Puffers ('PBS') (Parpart et al. 1947) folgender Zusammensetzung gewaschen:

PBS 0,03 Molar

$\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$ 290 mosm/kg

pH 7,42 bei 25 °C

Nach jedem Waschen erfolgte die Zentrifugation wie oben beschrieben.

Die Erythrozyten aus 5 ml Blut wurden als Kontrollprobe in der vierfachen Menge Phosphat-Puffer suspendiert und in einem Wasserbad bei einer Schüttelfrequenz von 80-90/min und 37 °C 45 Minuten inkubiert.

Die Erythrozyten aus 15 ml Blut wurden zur Erhöhung der 2,3-DPG-Konzentration und der Gesamtkonzentration an organischen Phosphaten in der vierfachen Menge eines isotonen Inosin-Pyruvat-Phosphat-Mediums (IPP) folgender Zusammensetzung inkubiert:

0,26823 g Inosin

0,11005 g Pyruvat-Na

0,55643 g Na_2HPO_4

0,14925 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

0,43830 g NaCl

100 µl Albumin 20 g/dl ad 100 ml aqua dest.

pH 7,4, Osmolalität 270-300 mosm/kg

Für die vergleichende Bestimmung der 2,3-DPG-Konzentration und der Elongation wurden nach 45 Minuten Inkubation die in Phosphat und die in IPP befindlichen Erythrozyten zentrifugiert, zweimal in Phosphat gewaschen und nochmals zentrifugiert.

Die in IPP inkubierten 'super cells' wurden anschließend in autologes Plasma resuspendiert. Je ein Teil wurde 60 und 180 Minuten in Plasma bei 37 °C inkubiert, um evtl. Veränderungen der 2,3-DPG-Konzentration und der Verformbarkeit zu untersuchen.

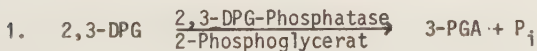
2.2. Bestimmung der 2,3-DPG-Konzentration in Erythrozyten

Die 2,3-DPG-Konzentration der Erythrozyten wird nach SIGMA Technical Bulletin No. 35-UV (2-80), einer Modifikation der Methode nach Rose und Liebowitz (1970), bestimmt.

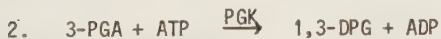
In der Reaktion wird der proteinfreie Überstand einer Erythrozyten-Suspension von bekanntem Hämatokrit nach Trichloressigsäurefällung eingesetzt.

Es laufen drei enzymatische Reaktionen ab.

- Unter Stimulation durch 2-PG (2-Phosphoglycerat) wird 2,3-DPG zu 3-PGA (3-Phosphoglycolsäure) und anorganischem Phosphor hydrolysiert.



- Diese Reaktion wird gekoppelt mit der PGK-Reaktion (Phosphoglyceratphosphokinase), die das 3-PGA in 1,3-DPG und ADP überführt.



- Schließlich oxidiert 1,3-DPG in der Indikatorreaktion NADH zu NAD in Anwesenheit von GAPD (Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase) und wird zu G-3-P (Glyceraldehyd-3-Phosphat) reduziert.



In dieser Meßreaktion wird die Abnahme der NADH-Extinktion bei 340 nm gemessen. Die dabei oxidierte NADH-Menge ist proportional der 2,3-DPG-Konzentration im Blut und die Rechnungen basieren auf dem molaren Extinktionskoeffizienten von NADH.

Die 2,3-DPG-Konzentration in den gepackten Zellen (Erythrozyten) berechnet sich mit Hilfe des Hämatokrits wie folgt:

$$2,3\text{-DPG}_{\text{gepackte Zellen}} (\mu\text{mol/ml}) = \frac{\text{Blut-2,3-DPG } (\mu\text{mol/ml})}{\text{Hämatokrit } (\%)} \times 100$$

Normalwerte für 2,3-DPG in gepackten Zellen ($\mu\text{mol/ml}$) nach SIGMA Technical Bulletin No. 35-UV (2-80):

Männer: $4,8 \pm 0,3$

Frauen: $5,3 \pm 0,4$

2.3. Durchführung der Scherversuche zur Bestimmung der Verformbarkeit von Erythrozyten

Zur Bestimmung der Verformbarkeit von Erythrozyten im Rheoskop wurden mit der Hamilton-Glasspritze 2 μl gepackte Zellen in ein "Eppendorfhütchen" mit 100 μl 20%iger Dextran-Phosphat-Pufferlösung (Dextran T 70, $\bar{M}_w$ 70.000, Viskosität 21,2 cP bei 25 °C, Pharmacia Fine Chemical, Uppsala, Schweden) suspendiert.

Der Zusatz von Dextran ist erforderlich, um die Viskosität des Suspensionsmediums zu erhöhen und somit Verformung der Erythrozyten im Rheoskop zu bewirken: Verformung resultiert aus der einwirkenden Scherkraft, die sich als Produkt der Suspensionsviskosität und der Scherrate errechnet.

Humanalbumin wurde zugesetzt, um die Bildung von Echinozyten (Stechäpfeln) zu verhindern.

Zentraler Bestandteil des von Schmid-Schönbein (Schmid-Schönbein et al. 1973, v. Gosen 1977) entwickelten Rheoskops (Fa. Klotz, München) ist die gegenrotatorische Platte-Kegel-Kammer (siehe Abb. 3), in der Erythrozyten geschert werden können. Diese Strömungskammer wurde in einigen Details verändert, um die Reproduzierbarkeit und Justierbarkeit des Strömungsfeldes zu verbessern (Klose 1983).

Unter der Scherrate ($\dot{\gamma}$) ist der scheinbare Geschwindigkeitsgradient zu verstehen, der sich aus der Bewegung von Platte und Kegel ergibt; diese drehen sich mit der gleichen Frequenz gegeneinander. Über den an ein Potentiometer gekoppelten Regelantrieb werden Scherraten zwischen 25 und 280 sec^{-1} vorgegeben. Die auf die Erythrozyten einwirkende Scherkraft τ ist das Produkt aus Scherrate $\dot{\gamma}$ und Viskosität η der Dextranlösung.

Für die mikroskopische Beobachtung der Zellen wurde ein invertiertes Mikroskop mit Durchlicht-Interferenz-Kontrastoptik (Modell Diavert, Fa. Leitz, Wetzlar), Objektiv 40/o, 65 P, verwendet. Die Betrachtung erfolgte durch eine Binokulartubus mit Brillenokularen einer Lupenvergrößerung von 10. Zur Mikrophotographie wurden eine Kleinbildkamera mit Blitzgerät (Modell Leica MdA, Fa. Leitz, Wetzlar) und hochempfindliche Filme HP5 (Ilford) benutzt.

Von der 2 %igen Erythrozytensuspension wurden $10 \mu\text{l}$ in die Platte-Kegel-Kammer gebracht, eine Aufnahme in Ruhe und je eine Aufnahme bei fünf verschiedenen Scherraten gemacht. Es wurden Scherversuche von den in Phosphat inkubierten Kontrollerythrozyten (Parpart₀) und den 'super cells' (IPP₀) nach 45 Minuten Inkubation in IPP (IPP₀) sowie nach weiterer Inkubation von 60 (IPP₆₀) und 180 Minuten (IPP₁₈₀) in autologem Plasma vorgenommen.

Zur Auswertung wurden die Negative mit Hilfe eines Vergrößerungsgerätes (Modell 609, Fa. Durst, München) auf eine Mattscheibe projiziert (Vergrößerung ca. 5,5). Die Länge L der Zellen wurde parallel zur Strömungsrichtung, die Breite B senkrecht dazu mit einem Lineal ausgemessen und daraus für jede Zelle die scheinbare Elongation nach der Formel

$$E' = \frac{(L' - B)}{(L' + B)}$$

berechnet. Der Einfachheit halber wird nur von Elongation gesprochen, obwohl die gemessenen Längen L' der Zellen etwas kürzer sind als die tatsächlichen Längen L, da nur die Projektion der langen Hauptachse auf die optische Ebene gemessen werden kann (Fischer 1978, Klose 1983).

Von jedem Negativ wurden 20 - 25 Zellen ausgewertet und dann die mittlere Elongation bestimmt.

2.4. Bestimmung von Hämatokrit, pH und Osmolarität

Der Hämatokrit wurde nach der Mikromethode in einer Zentrifuge⁺) mit 12.000 Umdrehungen pro Minute und 12.000 g Beschleunigung bestimmt (Dittrich 1963). Das Blut wurde 10 Minuten zentrifugiert.

Der Hämatokrit wurde mit dem Faktor 0,98 korrigiert, der das in der Erythrozytensäule verbleibende 'trapped plasma' berücksichtigt (Linderkamp et al. 1974).

Der pH wurde mit dem pH-Meter PHM 64⁺⁺) gemessen. Die Inkubationslösungen wurden mit NaOH auf den gewünschten pH titriert.

In ein Schliffhütchen wurden 150 µl Analysenmaterial pipettiert und die Osmolarität mittels eines Halbmikro-Osmometers⁺⁺⁺) bestimmt.

2.5. Statistik

Die statistische Analyse der Meßergebnisse umfaßte folgende Schritte:

Die Berechnung von arithmetischem Mittel ($\bar{x}$), Standardabweichung, Varianz, Variationskoeffizient, Standardfehler des Mittelwertes (SEM) und Prüfen auf Normalverteilung anhand des sogenannten R/SD-Quotienten der einzelnen Proben; Prüfen der Differenzen der Mittelwerte von mehr als zwei Stichproben für unverbundene Daten mit der Rangvarianzanalyse nach Kruskal-Wallis in Verbindung mit dem Dunn-Test (Sachs 1978).

P-Werte (zweiseitig) von weniger als 0.05 wurden als signifikant betrachtet.

⁺) Hawksley Ltd., London

⁺⁺) Radiometer, Kopenhagen

⁺⁺⁺) Knauer, Eppelheim

Eichlösung: Knauer 044300, 400 mosm/kg, 12,687 g NaCl/kg H₂O

III. ERGEBNISSE

3.1. Die erythrozytären 2,3-DPG-Konzentrationen unter verschiedenen Inkubationsbedingungen

Aus Tab. 1 sind die mittleren 2,3-DPG-Konzentrationen der in Phosphatpuffer (PBS) inkubierten Kontrollerythrozyten und der in Inosin-Pyruvat-Phosphat-(IPP)-Puffer inkubierten und anschließend für 60 bzw. 180 Minuten in autologem Plasma inkubierten 'super cells' ersichtlich.

Bei den 45 Minuten in IPP-Puffer (IPP_0) inkubierten Erythrozyten konnte ein Anstieg der 2,3-DPG-Konzentration im Mittel auf $12,26 \mu\text{mol/ml}$ gepackte Erythrozyten festgestellt werden. Dies entspricht dem 2,3-fachen des Normalwertes von $5,3 \pm 0,4 \mu\text{mol/ml}$ (SIGMA Technical Bulletin No. 35-UV).

Im Gegensatz dazu fiel bei den 45 Minuten in Phosphatpuffer (Parpart_0) inkubierten Kontrollerythrozyten die 2,3-DPG-Konzentration von $5,3 \pm 0,4 \mu\text{mol/ml}$ im Mittel auf $4,37 \mu\text{mol/ml}$ ab. Dies entspricht einer mittleren Konzentrationsabnahme um 17,5 %.

Nach 60 Minuten Inkubation in autologem Plasma (IPP_{60}) wurde im Mittel eine 2,3-DPG-Konzentration von $12,38 \mu\text{mol/ml}$ und nach 180 Minuten (IPP_{180}) von $12,91 \mu\text{mol/ml}$ gemessen. Es trat somit während einer dreistündigen Inkubation in Eigenplasma keine Verringerung der durch die IPP-Einwirkung erreichten hohen DPG-Konzentration ein.

3.2. Die Verformbarkeit von Erythrozyten unter verschiedenen Inkubationsbedingungen

Die Mittelwerte sind in Tab. 2, die signifikanten Unterschiede in Tab. 3 zusammengestellt.

Die Erythrozyten wurden im Mikroskop in Ruhe und unter Scherung beobachtet und fotografiert. Die Verformung normaler Zellen nimmt mit der Scherrate zu, d.h., die Erythrozyten werden zunehmend zu Ellipsoiden elongiert (Abb. 9).

In Ruhe zeigten sowohl die Kontrollerythrozyten als auch die 'super cells' normale bikonkave Form.

Dagegen zeigten die 'super cells' bei den Scherversuchen eine hochsignifikant ($2p < 0.0001$) schlechtere Verformung als die Kontrollerythrozyten. Viele Zellen erschienen rigide, drehten sich senkrecht zur Scherrichtung um ihre Querachse und zeigten eine kugelige Gestalt (Abb. 5,6,10).

Nach 60 Minuten Inkubation in autologem Plasma zeigten die 'super cells' eine signifikante ($2p < 0.01$ bei Scherrate 184 und 282) Verbesserung der Verformung, ohne jedoch die Elongationswerte der Kontrollgruppe zu erreichen (Abb. 5,6,10, Tab. 2,3).

Nach 180 Minuten Inkubation verbesserte sich die Verformung der Erythrozyten weiter ($2p < 0.001 - 0.0001$). Sie erreichten aber ebenfalls nicht ganz die Werte der Kontrollgruppe. Dieser Effekt der Inkubation in Eigenplasma war bei allen Scherraten von 28 - 282 hochsignifikant. Nur bei Scherrate 282 ließ er sich nicht mehr so klar demonstrieren, da bei so hohen Scherraten schließlich auch die relativ rigiden IPP₀-Zellen noch beträchtlich elongiert wurden, während die Elongation von Kontroll- und plasmainkubierten Zellen in diesem oberen Scherbereich kaum mehr weiter zunahm (Abb. 5,6,10, Tab. 2,3).

Diese unterschiedliche Verformung von Erythrozyten unter verschiedenen Inkubationsbedingungen zeigen die Photos in Abb. 10. Grundsätzlich stieg die Erythrozytenverformung proportional zu den Scherraten an. Die Photos in Abb. 9 zeigen stellvertretend die zunehmende Verformung der Zellen mit steigender Scherrate bei den in Phosphatpuffer inkubierten Kontrollerythrozyten (Abb. 5,7, Tab. 2).

Als wesentliches Ergebnis dieser Untersuchung fand sich somit, daß die verringerte Verformbarkeit von artefiziell DPG-angereicherten Erythrozyten in Eigenplasma wieder hochsignifikant zunimmt. Im Gegensatz dazu verändert sich die 2,3-DPG-Konzentration während einer dreistündigen Einwirkung von Plasma nicht.

Die schlechtere Verformbarkeit der Erythrozyten durch Inkubation in einem Medium, das die 2,3-DPG-Konzentration erhöht, verbessert sich also in Eigenplasma trotz gleichbleibender 2,3-DPG-Konzentration. Die erreichte Verformbarkeit resultiert somit hauptsächlich aus ungünstigen Eigenschaften des die 2,3-DPG-Konzentration erhöhenden Mediums und allenfalls teilweise aus der 2,3-DPG-Zunahme.

IV. DISKUSSION

Die Gabe von Blut mit erniedrigter Sauerstoff-Affinität zur Therapie von Zuständen mit genereller oder lokaler Gewebshypoxie (z.B. ateminsuffiziente Neugeborene, Koronarsklerose), bei denen kardiozirkulatorische Kompensationsmechanismen ausgeschöpft sind, ist verschiedentlich diskutiert worden (Bakker 1978, Gersonde and Nicolau 1979, Duhm 1982).

Eine Möglichkeit, die O_2 -Affinität des Hämoglobins in Erythrozyten artefiziell zu erniedrigen, besteht in der Erhöhung der 2,3-DPG-Konzentration durch Inkubation der Zellen in einem Medium, das Inosin, Pyruvat und Phosphat enthält ('super cells'). Jedoch haben die Erythrozyten unmittelbar nach einer solchen Inkubation wesentlich beeinträchtigte Fließeigenschaften; sie sind sehr schwer deformierbar (Kleber 1982). Damit steht die therapeutische Anwendbarkeit solcher Zellen aus Gründen der beeinträchtigten Mikrozirkulation infrage.

Es ist aber möglich, daß sich die Deformabilität solcher Erythrozyten nach einer Transfusion, d.h. wenn sich die Zellen in physiologischem Medium befinden, rasch bessert. Die Untersuchung dieser Möglichkeit ist Gegenstand dieser Arbeit.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, festzustellen, ob und wenn, wie rasch durch eine Inkubation in autologem Plasma eine Senkung der artefiziell erhöhten 2,3-DPG-Konzentration von 'super cells' einerseits und eine Verbesserung der rheologischen Eigenschaften dieser Erythrozyten andererseits eintritt.

Wir konnten zunächst bestätigen, daß durch die Inkubation in IPP eine Erhöhung des intrazellulären 2,3-DPG-Gehaltes erzielt werden kann und daß sich diese so erzeugten 'super cells' schlechter verformen als Kontrollerythrozyten (Keitt et al. 1971, Kleber 1982). Wesentliches Ergebnis dieser Arbeit ist, daß die rheologischen Eigenschaften dieser Erythrozyten durch 180 Minuten währende Inkubation in autologem Plasma fast auf die Kontrollwerte verbessert wurden, ohne daß eine Abnahme des 2,3-DPG-Gehaltes auftrat.

Nach unseren Untersuchungen ist die verschlechterte Verformbarkeit von 'super cells' auf einen DPG-abhängigen und einen DPG-unabhängigen Teil zurückzuführen.

Der Einfluß des DPG selbst auf die Verformbarkeit ist danach gering. Die Mechanismen, über die dieser Einfluß zustande kommen könnte, sollen wie folgt näher diskutiert werden.

2,3-DPG bindet erstens Hb und vermutlich auch einige Enzyme und verändert dadurch ihre funktionellen Eigenschaften. Zweitens ist es durch seine Beteiligung als nicht penetrierendes Anion wesentlich an der Einstellung der transmembranalen Konzentrationsgradienten von Ionen einschließlich Wasserstoffionen (Donnan-Gleichgewicht) beteiligt (Duhm 1972).

Die aus zwei Kompartimenten bestehende Erythrozyten-Suspension (rote Zellen und Medium) ist durch eine Membran getrennt, die für Hämoglobin und 2,3-DPG impermeabel, aber für kleine Anionen wie Cl^- , HCO_3^- und OH^- durchlässig ist. Die hohe Anionenpermeabilität für den schnellen Austausch von Cl^- gegen HCO_3^- ist mit einer niedrigen Kationenpermeabilität verbunden. Die permeablen Ionen sind nach dem Donnan-Gleichgewicht

$$A_e^- \cdot K_e^+ = A_i^- \cdot K_i^+$$

zwischen beiden Kompartimenten aufgeteilt. Die Verteilung wird überwiegend von der intrazellulären Konzentration an Molekülen beeinflusst, die aufgrund ihrer Größe die Erythrozytenmembran nicht penetrieren können (Duhm 1971). Dabei werden intrazellulär der erhöhte kolloidosmotische Druck (impermeable Proteine) und der osmotische Druck (höhere Konzentration an permeablen Ionen) wirksam. Der osmotisch bedingte Wassereinstrom wird verhindert, indem Na^+ in den Extrazellulärraum transportiert wird.

Eine intrazelluläre 2,3-DPG-Erhöhung (z.B. nach Inkubation in IPP-Lösung) führt zu einer Verschiebung des Donnan-Gleichgewichtes an der Erythrozytenmembran und somit zu einer Umverteilung aller miteinander in Wechselbeziehung stehenden Ionen. Die durch 2,3-DPG induzierte Änderung des Donnan-Gleichgewichtes betrifft deshalb eine Anzahl von physiologischen Eigenschaften des Erythrozyten.

Aufgrund seiner Wirkung auf das Donnan-Gleichgewicht führt eine hohe 2,3-DPG-Konzentration zur Abnahme

- des intrazellulären pH
- der intrazellulären Cl^- und HCO_3^- -Konzentration
- des intrazellulären Wassergehaltes.

Die Verformbarkeit der Erythrozyten hängt im wesentlichen von vier Faktoren ab (Meiselman 1981, Linderkamp and Meiselman 1982):

- a) Zellmorphologie (z.B. bikonkave Diskozyten, Echinozyten, Stomatozyten)
- b) Zellgeometrie einschließlich des Oberflächen-Überschusses
- c) Viskosität der intrazellulären Flüssigkeit
- d) viskoelastische Eigenschaften der Erythrozytenmembran

Im folgenden wird versucht, den Effekt von 2,3-DPG auf die genannten Faktoren zu beschreiben:

- a) Typische morphologische Ursachen für den Verlust der normalen Verformbarkeit liegen in der Ausbildung von Echinozyten und Stomatozyten (Meiselman 1981).

Echinozyten entstehen insbesondere als Artefakt bei Änderung der elektrischen Ladung als Folge von ATP-Verarmung oder bei Fettstoffwechselstörungen. Artefizielle Echinozytenbildung wurde in der eigenen Arbeit durch Zusatz von Albumin vermieden. ATP-Verarmung wäre eher bei Inkubation in Puffer oder Plasma ohne Zusatz von Inosin zu erwarten. Stomatozyten entstehen bei hereditären Störungen oder in vitro durch Einwirkung bestimmter Substanzen wie Chlorpromazin, welche das Membranskelett lockern. In der eigenen Untersuchung wurden weder Echinozyten noch Stomatozyten oder andere morphologische Abweichungen beobachtet.

- b) Die Zellgeometrie wird hauptsächlich durch Änderung des Oberflächen/Volumen-Verhältnisses (genauer des Oberflächen-Überschusses für das zu umschließende Volumen) bestimmt (Linderkamp and Meiselman 1982, Linderkamp et al. 1983).

Der Oberflächen-Überschuß ermöglicht die Verformung des Erythrozyten ohne Dehnung der Membran. Verminderung des Oberflächen-Überschusses durch Membranverlust oder Schwellung der Erythrozyten führt zur Ausbildung

schlechter verformbarer Sphärozyten (Schmid-Schönbein and Wells 1971, Klose et al. 1981, Linderkamp and Meiselman 1982). Mambbranverlust entsteht durch Einwirkung hoher Scherkräfte bzw. Verminderung der Membranstabilität und Einwirkung mäßiger Scherkräfte (Waugh and La Celle 1980) und geht mit Wasserverlust einher, so daß die MCHC ansteigt und das MCV abnimmt (z.B. Sphärozytose, alternde Erythrozyten).

Schwellung von Erythrozyten durch Flüssigkeitseinstrom entsteht bei verminderter Osmolarität des Suspensionsmediums oder erhöhter Osmolarität der Intrazellulärflüssigkeit. In diesem Fall nimmt das Volumen der Erythrozyten (MCV) zu, die Hämoglobinkonzentration (MCHC) ab. Anstieg des 2,3-DPG könnte eher zu Wasserverlust, d.h. Schrumpfung der Zellen, nicht aber zu Zellschwellung führen, da es das Donnan-Gleichgewicht beeinflußt (s.o.). Wie in der vorausgehenden Arbeit gezeigt werden konnte, sind 'super cells' tatsächlich kleiner als Kontrollzellen (Kleber 1982).

c) Die intrazelluläre Viskosität hängt hauptsächlich von der MCHC ab (Ross and Minton 1977, Williams and Morris 1980, Linderkamp et al. 1982). Die Viskosität steigt mit zunehmender Hämoglobin-Konzentration exponentiell an. Änderungen der intrazellulären Hb-Konzentration (MCHC) entstehen bei Einstrom von Wasser (Schwellung) und Ausstrom von Wasser (Schrumpfung). Wie bereits beschrieben, besitzt 2,3-DPG einen deutlichen Effekt auf das Gibbs-Donnan-Gleichgewicht und kann über diesen Mechanismus zu Schrumpfung der Erythrozyten und über den Anstieg der MCHC zur Erhöhung der inneren Viskosität der Erythrozyten führen.

Nur am Rande sei bemerkt, daß nicht nur eine Erhöhung oder Verringerung der Hämoglobin-Konzentration, sondern auch Änderungen der physikalisch-chemischen Eigenschaften des Hämoglobin die intrazelluläre Viskosität beeinflussen. Z.B. treten bei Hämoglobin S unter Desoxygenation Quervernetzungen innerhalb des Hämoglobinmoleküls auf, was zu vollständigem Verlust der Verformbarkeit führen kann. Ähnliches trifft auch auf Erythrozyten mit Heinz-Innenkörpern, vor allem bei homozygoter β -Thalassämie, zu (Klose 1983).

2,3-DPG wird ein deutlicher Effekt auf die Hämoglobinfluidität zugeschrieben: Tillman et al. (1981a,b) fanden bei Patienten mit Diabetes mellitus und bei Neugeborenen sowohl verminderte Filtrierbarkeit als auch herabgesetzte 2,3-DPG-Konzentration der Erythrozyten. Danach wäre jedoch zu erwarten gewesen, daß sich die 'super cells' mit ihrer hohen 2,3-DPG-Konzentration besser und

nicht schlechter verformen als Kontroll-Erythrozyten. Oberdies haben Untersuchungen der Verformbarkeit von Erythrozyten diabetischer Patienten und Neugeborener unter besser standardisierten Bedingungen (z.B. im Rheoskop) normale Verformbarkeit ergeben (Linderkamp et al. 1982b, Sewchand et al. 1982). Schließlich haben Untersuchungen neugeborener Ferkel gezeigt, daß eine physiologische Zunahme der 2,3-DPG-Konzentration in vivo ohne Effekt auf die Erythrozytenverformbarkeit ist (Linderkamp et al., unveröffentlichte Daten).

d) den mechanischen Eigenschaften der flexiblen Erythrozytenmembran, deren spezielle biophysikalische Struktur die Verformbarkeit ermöglicht, kommt besondere Bedeutung für die Verformbarkeit der Erythrozyten zu.

Die Membran besteht hauptsächlich aus der Lipiddoppelschicht mit eingelagerten Proteinen und dem Spektrin-Aktin-Netzwerk ('Cytoskelett'), das die Innenschicht der Membran bildet. Das Cytoskelett ist wesentlich für die Membranelastizität, die Lipidmatrix für die Membranviskosität verantwortlich (Evans and La Celle 1975, Hochmuth et al. 1979). Das Cytoskelett wirkt wie ein fester Körper, ist aber biegsam und setzt der Verformung durch eine einwirkende Kraft elastischen Widerstand entgegen. Dieser Widerstand gegen elastische Verformung wird als elastischer Schermodul gemessen. Er bestimmt das Ausmaß, nicht die Geschwindigkeit der Verformung.

Eine deutliche Zunahme des elastischen Schermodul (d.h. verminderte Elastizität) weisen Sichelzellen (Nash et al. 1984) und Eisenmangelerythrozyten (Yip et al. 1983) auf. Keinen oder einen nur geringfügigen Effekt auf den Schermodul besitzen das Alter der Erythrozyten (Linderkamp and Meiselman 1982) und ATP-Verarmung (Meiselman et al. 1978). Bei Neugeborenen liegt der elastische Schermodul um 10 % niedriger als beim Erwachsenen (Linderkamp et al. 1982a). 2,3-DPG bindet sich nicht nur an das Hämoglobin, sondern auch an Proteine des Cytoskeletts. Außerdem soll 2,3-DPG die Bindung von Hämoglobin an das Cytoskelett vermindern. Es wird angenommen, daß hierdurch die Membranelastizität verbessert wird (Tillman et al. 1977, 1981a+b). Schlüssige Beweise hierfür gibt es nicht. Die eigenen Untersuchungen ergaben eine verminderte Verformbarkeit der 'super cells', was gegen einen günstigen Effekt von 2,3-DPG auf die Membranelastizität spricht.

Im Gegensatz zum Cytoskelett besitzt die Lipidmatrix überwiegend Eigenschaften einer Flüssigkeit, setzt einwirkenden Kräften also keinen elastischen Widerstand entgegen. Dagegen ist sie viskös und entscheidet wesentlich über die Geschwindigkeit der Verformung, nicht aber über das Ausmaß (Evans and La Celle 1975, Hochmuth et al. 1979, Linderkamp and Meiselman 1982).

Nach neuesten Untersuchungen hat auch die Menge an membrangebundenem Hämoglobin wesentlichen Anteil an der Membranviskosität (Nash and Meiselman 1983, Nash et al. 1984). Dies könnte die Zunahme der Membranviskosität alter Erythrozyten und von Sichelzellen erklären. Wie bereits erwähnt, soll 2,3-DPG die Menge von membrangebundenem Hämoglobin herabsetzen (Tillman et al. 1981a+b). Verminderte 2,3-DPG-Konzentration und erhöhte Membranviskosität findet sich in alten Erythrozyten (Linderkamp and Meiselman 1982). Die Erythrozyten Neugeborener weisen eine geringfügig (um ca. 10 %) erhöhte Membranviskosität und beträchtlich verminderte 2,3-DPG-Konzentration auf (Linderkamp et al. 1982b, Tillman et al. 1981a+b). Bei Diabetes mellitus finden sich ebenfalls niedrige 2,3-DPG-Konzentrationen, die Membranviskosität ist aber normal (Sewchand et al. 1982). Der Einfluß von 2,3-DPG auf die Membran kann also nicht bedeutsam sein.

Zusammengefaßt erscheint der von uns beobachtete Effekt der Verminderung der Verformbarkeit von Zellen mit erhöhtem 2,3-DPG vor allem durch die Erhöhung der MCHC erklärt werden zu können (s.o.). Dagegen liegen über einen direkten DPG-Einfluß auf die Membran widersprechende Befunde vor.

Einige Befunde sprechen dafür, daß 2,3-DPG sowohl einen günstigen als auch einen ungünstigen Einfluß auf Eigenschaften der Erythrozyten besitzen könnte. Andere in der Literatur mitgeteilten Befunde sprechen aber gegen jeglichen Effekt von 2,3-DPG auf die Verformbarkeit der Erythrozyten.

Die eigenen Ergebnisse zeigen einen ungünstigen Effekt von 2,3-DPG, der allerdings nach Inkubation in Plasma weitgehend aufgehoben wird. Die verminderte Verformbarkeit der 'super cells' scheint somit nur zum Teil auf Änderung der 2,3-DPG-Konzentration zu beruhen. Der bedeutendere DPG-unabhängige Teil der Verschlechterung der Verformbarkeit ist in den beiden verwendeten Suspensionsmedien - Phosphat für die Kontrollerythrozyten, IPP für die Herstellung der 'super cells' - zu suchen. Da beide einen normalen

pH von 7,4 und eine normale Osmolalität von 270-300 mosm/kg aufwiesen und die Konzentration der Puffersubstanzen (Phosphate, NaCl) ebenfalls gleich waren, müssen die Unterschiede durch Inosin und/oder Pyruvat verursacht worden sein.

Allerdings ist hier nicht nur an diese Substanzen selbst zu denken, sondern auch an reversible Ionenverschiebungen, Konzentrationsänderungen von Membran- und Cytosolbestandteilen, und an Metabolite, die während der IPP-Inkubation entstehen und evtl. in Plasma ausgewaschen werden.

Jedenfalls zeigen die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen, daß die Verminderung der Erythrozytenverformbarkeit durch Inkubation in Plasma weitgehend reversibel ist, ohne daß die 2,3-DPG-Konzentration wieder abnimmt. Ob während der Plasmainkubation Substanzen eliminiert werden, welche die Verformbarkeit vermindern, oder Substanzen im Plasma die Störung der Membran 'reparieren', kann aufgrund der vorliegenden Daten nicht entschieden werden.

Da fetales Hämoglobin das 2,3-DPG nicht mit derselben Affinität binden kann wie Erwachsenen-Hämoglobin, haben Früh- und Neugeborene einen niedrigeren O_2 -Halbsättigungsdruck und eine nach links verschobene O_2 -Bindungskurve. Sie steigt bei reifen Kindern in den ersten drei Lebensmonaten langsam an, um im 4.-6. Lebensmonat der der Erwachsenen zu ähneln. Daher wird diskutiert, daß sich Transfusionen bzw. Austauschtransfusionen mit frischem Erwachsenenblut auf Hypoxiezustände bei Früh- und Neugeborenen günstig auswirken könnten (Vermold et al. 1972). Hier läge, vorausgesetzt ihre rheologischen Eigenschaften ließen es zu, eine denkbare klinische Anwendungsmöglichkeit für 'super cells'; denn ein Vorteil von frischem Erwachsenenblut beruht darauf, daß bei Neugeborenen eine sofortige Rechtsverschiebung der O_2 -Bindungskurve erfolgt, was zur besseren O_2 -Abgabe an die Gewebe befähigt (Oski and Delivoria-Papadopoulos 1970). Diese Rechtsverschiebung konnte nach Transfusion von 4-5 Tage altem und somit 2,3-DPG-verarmten Blut nicht beobachtet werden. In unter normalen Blutbankbedingungen gelagertem Blut wurde eine signifikante Steigerung der O_2 -Affinität aufgrund des reduzierten 2,3-DPG-Gehaltes festgestellt (Valtis and Kennedy 1954). 'super cells' sollten eine noch stärkere Abnahme der O_2 -Affinität bewirken als frisch entnommene adulte Erythrozyten. Da 'super cells' mehr O_2 an die Gewebe abgeben können, könnte die Hb-Konzentration niedriger liegen, so daß weniger Transfusionen erforderlich werden.

Jetzt stellt sich aber die Frage, ob nicht verschlechterte Fließeigenschaften der 'super cells' die verbesserte O_2 -Versorgung durch Störung der Mikrozirkulation aufheben.

Zweifellos würden die nicht in Plasma inkubierten und damit schlechter verformbaren 'super cells' die Mikrozirkulation stören und außerdem rasch in der Milz zerstört werden. Die Transfusion von in Plasma inkubierten 'super cells' erscheint jedoch möglich, da ihre Verformbarkeit fast normal ist. Im Vergleich mit pathologischen Erythrozyten (Sichelzellen, Thalassämie, Sphärozyten) sind die in Plasma inkubierten 'super cells' sogar deutlich besser verformbar.

Abb. 8 vergleicht die Verformbarkeit dichtefraktionierter normaler und pathologischer Erythrozyten (Klose 1983) und die der 'super cells' der eigenen Untersuchung. Die Untersuchung von Klose (1983) enthält keine Daten unfraktionierter Erythrozyten. Hierdurch wird der Vergleich problematisch.

Der Hämoglobineffekt bei homozygoter und heterozygoter Sichelzellanämie führt zu einer signifikanten Verschlechterung der Erythrozytenverformung. Bei der homozygoten Sichelzellanämie zeigen junge und alte Erythrozyten eine reduzierte Verformung; bei der heterozygoten nur die Fraktion mit den älteren Erythrozyten.

Bei Patienten mit homozygoter und heterozygoter β -Thalassämie zeigen ebenfalls beide Fraktionen eine verminderte Erythrozytenverformung.

Auch bei der hereditären Sphärozytose kommt es zur extrem reduzierten Verformung der sphärozytenreichen dichteren Fraktion (Klose 1983).

Ein Vergleich der Verformbarkeit unserer für 180 Minuten in autologem Plasma inkubierten 'super cells' (IPP_{180}) mit der von Erythrozyten bei angeborenen und erworbenen Erkrankungen im Kindesalter läßt bei der homozygoten Sichelzellanämie für beide Fraktionen auf einen Vorteil unserer 2,3-DPG-angereicherten Zellen schließen. Bei der homozygoten Thalassämie und hereditären Sphärozytose zeigen unsere Zellen nur eine bessere Verformung gegenüber den gealterten Zellpopulationen (siehe Abb. 8).

Da die mittlere Verformbarkeit unfraktionierter Erythrozyten zwischen der Verformbarkeit alter und junger Erythrozyten liegt (Linderkamp et al. 1982b), ist anzunehmen, daß die unfraktionierten Erythrozyten von Patienten mit Thalassämie, Sichelzellanämie und Sphärozytose weniger verformbar sind als die 'super cells'.

Wie aus Abb. 8 ersichtlich, liegt die Verformbarkeit von plasmainkubierten 'super cells' etwa in der Größenordnung der Erythrozyten bei Eisenmangel-Anämie. Die rheologischen Eigenschaften von 'super cells' scheinen somit - zumindest wenn sie vorher in Plasma inkubiert wurden - eine Transfusion solcher Zellen nicht auszuschließen. Um die klinische Anwendungsmöglichkeit weiter zu prüfen, sollte an Tiermodellen untersucht werden, ob und unter welchen Umständen sich die postulierte Verbesserung der Gewebe- O_2 -Versorgung durch 'super cells' tatsächlich nachweisen läßt.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel dieser Arbeit war, den 2,3-DPG-Gehalt und das rheologische Verhalten von 2,3-DPG-angereicherten Erythrozyten ('super cells') nach Resuspension in autologes Plasma zu untersuchen.

Durch Inkubation der Kontrollerythrozyten in Parpart-Lösung fiel die 2,3-DPG-Konzentration geringgradig ab. Bei den in IPP-Puffer inkubierten Erythrozyten konnte ein starker Anstieg des 2,3-DPG-Gehaltes und eine hochsignifikant ($2p < 0,00001$) schlechtere Verformung der Zellen festgestellt werden.

Resuspension der in IPP-Medium inkubierten 'super cells' in autologes Plasma führte nicht zu einer Senkung des 2,3-DPG-Gehaltes innerhalb 180 Minuten. Die resuspendierten Erythrozyten zeigten jedoch nach 60 Minuten Plasmainkubation (IPP_{60}) eine signifikante ($2p < 0,001$) und nach 180 Minuten (IPP_{180}) eine hochsignifikante ($2p < 0,001 - 0,00001$) Verbesserung der Verformung, ohne ganz die Werte der Kontrollgruppe zu erreichen.

Die Reduktion der Verformung der 'super cells' ist somit nur zum Teil auf den Anstieg des intrazellulären 2,3-DPG-Gehaltes zurückzuführen. Die signifikante Verbesserung der Rheologie nach Resuspension der Erythrozyten in autologes Plasma muß auf Erholungsvorgänge in der Zelle und an ihrer Membran zurückzuführen sein, die diskutiert werden.

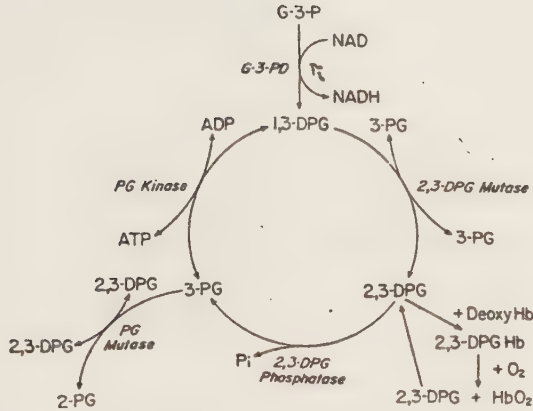


Abb. 1: 2,3-Diphosphoglycerat-Zyklus im menschlichen Erythrozyten
(nach Oski and Delivoria-Papadopoulos 1970)

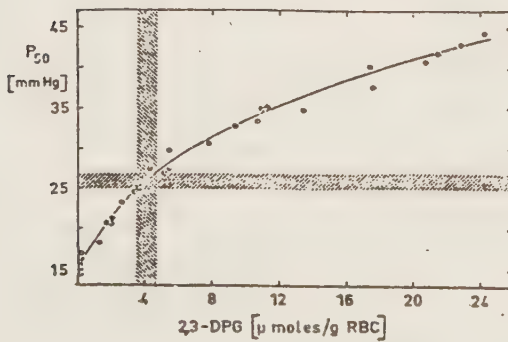


Abb. 2: Korrelation zwischen dem 2,3-DPG und dem P₅₀ (Sauerstoffpartialdruck bei 50 % O₂-gesättigtem Hämoglobin, 37 °C, pH 7,4) des Blutes
(nach Duhm 1971)

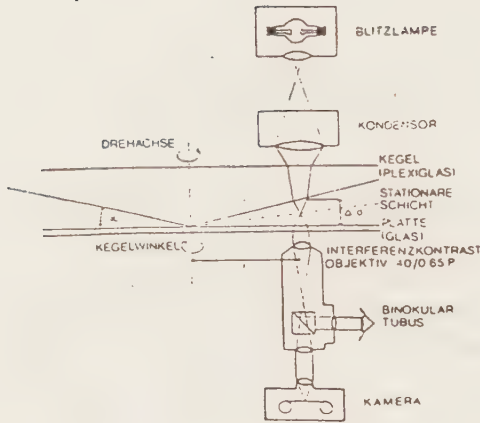


Abb. 3: Schematische Darstellung der rheoskopischen Meßanordnung mit gegenrotatorischer Platte-Kegel-Strömungskammer (nach Klose 1983)

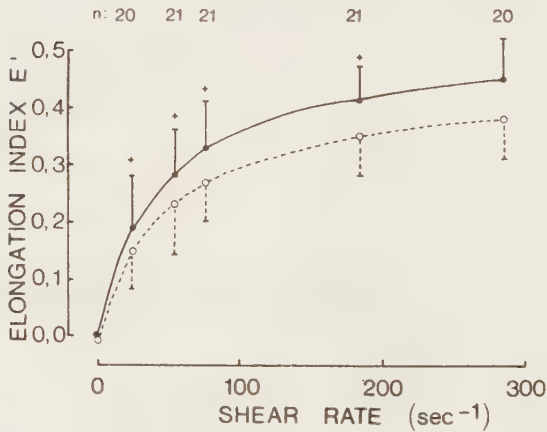


Abb. 4: Elongation von jungen (●) und gealterten (○) Erythrozyten von Kontrollprobanden in Abhängigkeit vom Schergrad. Jeweils einseitige Darstellung der Standardabweichung (nach Klose 1983)

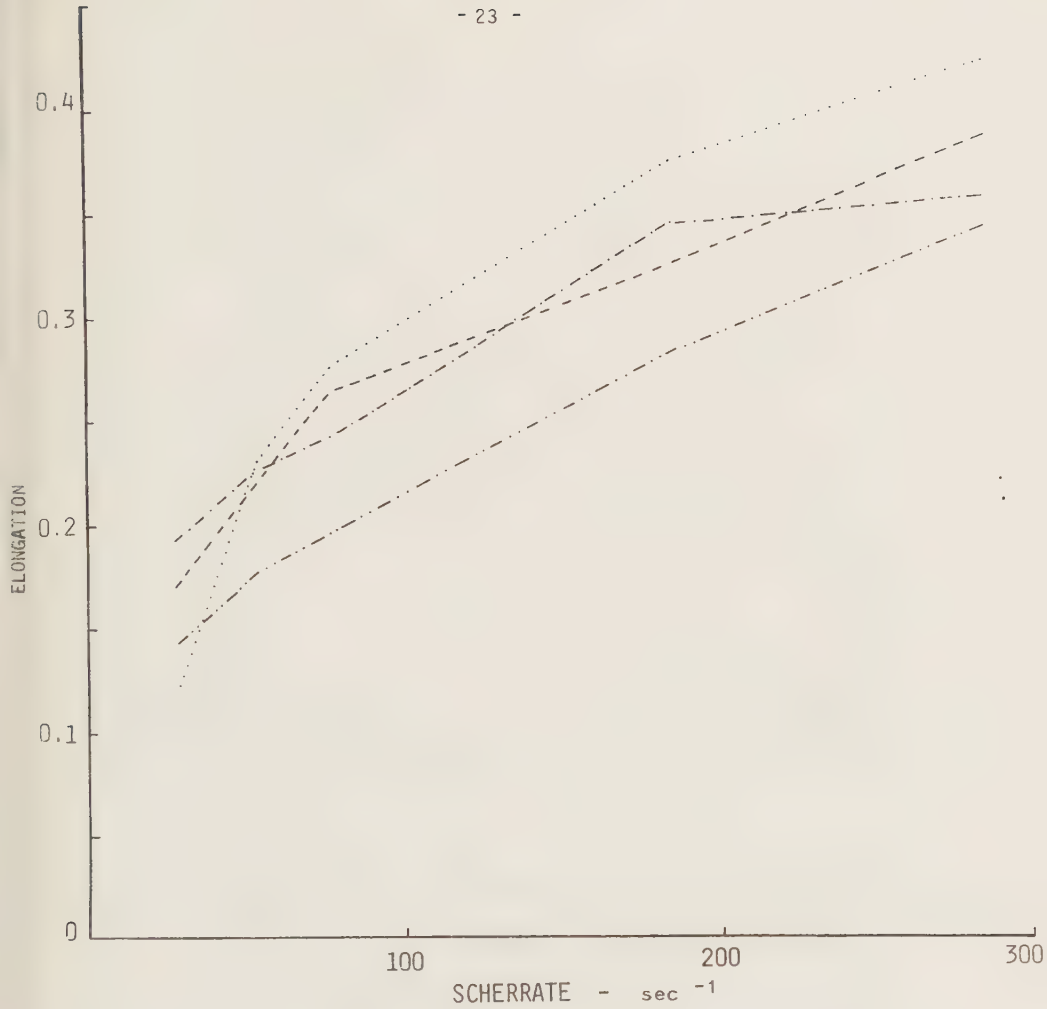


Abb. 5: Erythrozytenverformung in Abhängigkeit von der Scherrate

- = Parpart₀ (Kontrollerythrozyten)
- · - = IPP₀ ('super cells')
- = IPP₆₀ (60 Minuten in Plasma inkubiert)
- - - = IPP₁₈₀ (180 Minuten in Plasma inkubiert)

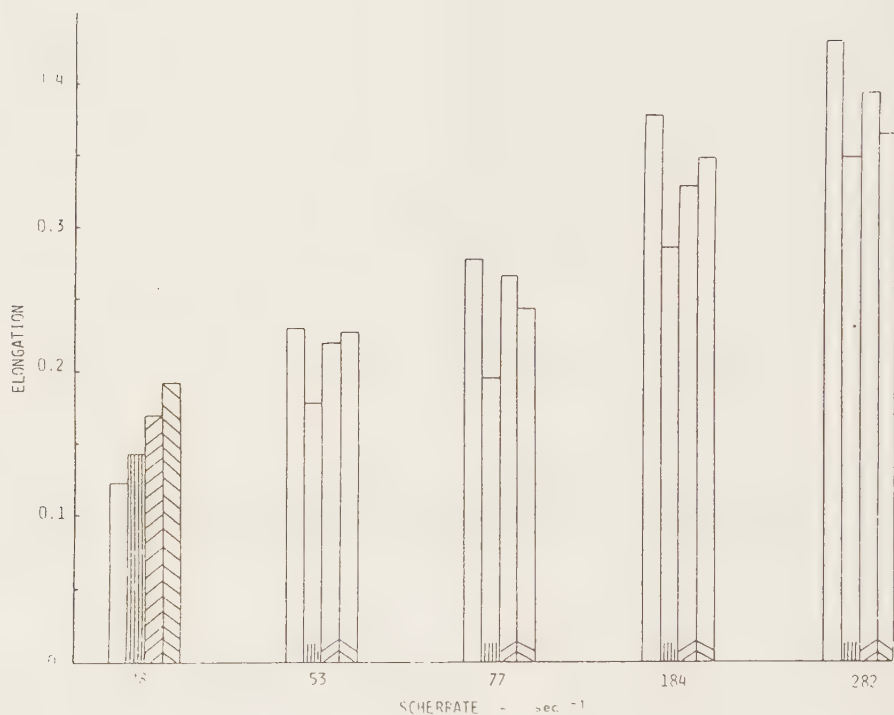


Abb. 6: Erythrozytenverformung in Abhängigkeit von der Scherrate

- = Parpart₀ (Kontrollerythrozyten)
- ▤ = IPP₀ ('super cells')
- ▨ = IPP₆₀ (60 Minuten in Plasma inkubiert)
- ▩ = IPP₁₈₀ (180 Minuten in Plasma inkubiert)

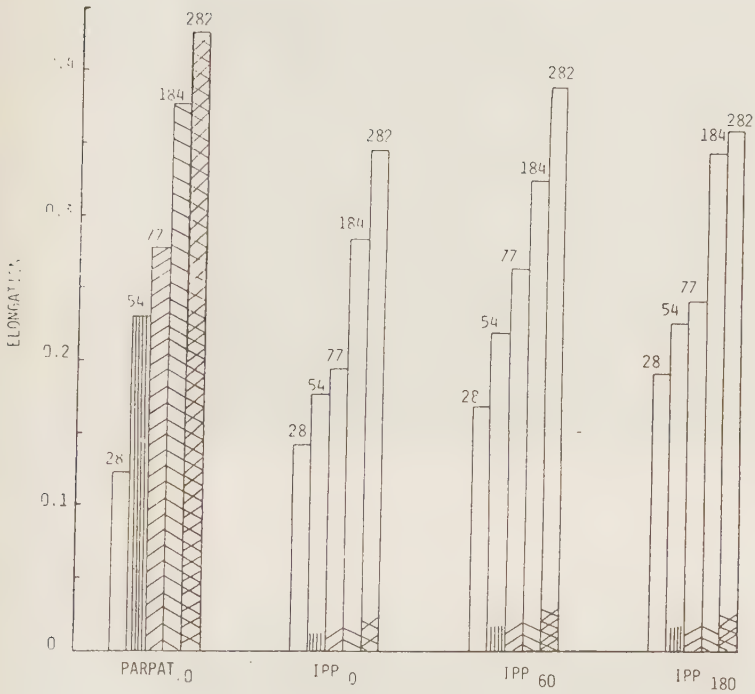


Abb. 7: Erythrozytenverformung bei unterschiedlich inkubierten Erythrozyten in Abhängigkeit von der Scherrate (28,54,77,184 und 282 sec^{-1})

Parpart₀ = Kontrollerythrozyten

IPP₀ = 'super cells'

IPP₆₀ = 'super cells' nach 60 Minuten Inkubation in autologem Plasma

IPP₁₈₀ = 'super cells' nach 180 Minuten Inkubation in autologem Plasma



Abb. 8: Verformbarkeit verschiedener Arten von Erythrozyten bei Scherrate 184 sec^{-1}

N.j. = normale Erythrozyten, junge Population

N.a. = " , gealterte Population

P₀ = Parpart-inkubierte Kontrollerythrozyten, nicht aufgetrennt

'S' = 'super cells', nicht aufgetrennt

IPP₁₈₀ = 180 Minuten in Plasma inkubierte 'super cells', nicht aufgetrennt

E.j. = Eisenmangelanämie, junge Population

E.a. = " , gealterte Population

Sph.j. = hereditäre Sphärozytose, junge Population

Sph.a. = " " , gealterte Population

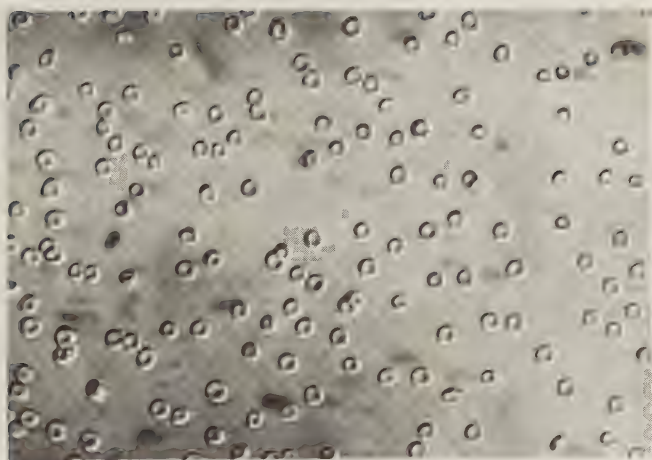
Th.j. = homozygote Thalassämie transfundiert, junge Population

Th.a. = " " " , gealterte Population

Si.j. = homozygote Sichelzellanämie, junge Population

Si.a. = " " , gealterte Population

2)



3)



c)



d)

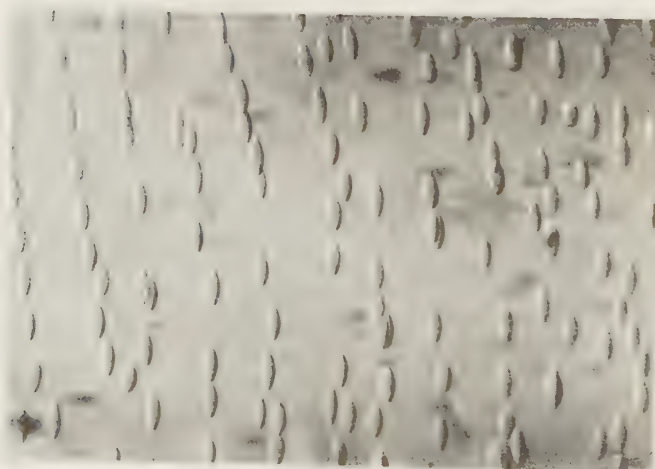


Abb. 9

e)



f)

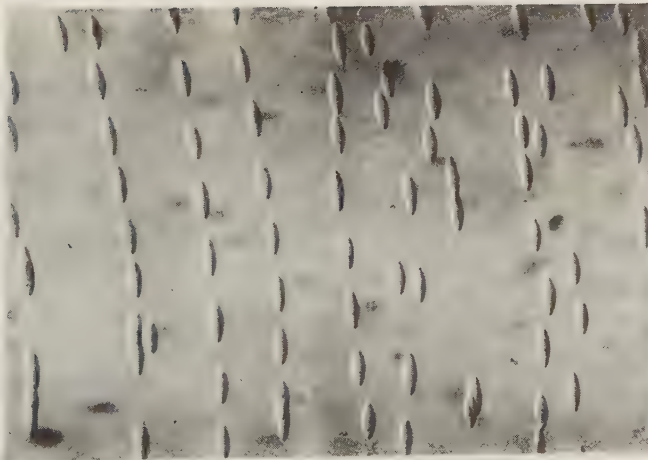


Abb. 9: Erythrozytensuspensionen der in Phosphatpuffer inkubierten Kontroll-erythrozyten in Abhängigkeit von der Scherrate

- | | |
|-------------------------|--------------------------|
| a) Stop | d) 77 sec^{-1} |
| b) 28 sec^{-1} | e) 184 sec^{-1} |
| c) 53 sec^{-1} | f) 282 sec^{-1} |

a)



b)

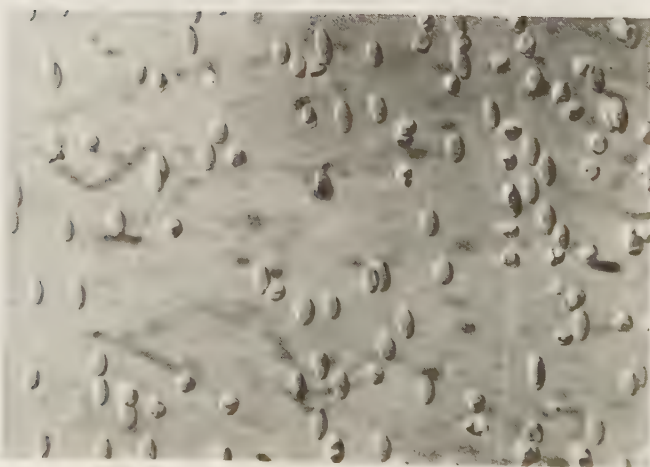


Abb. 10

c)



d)

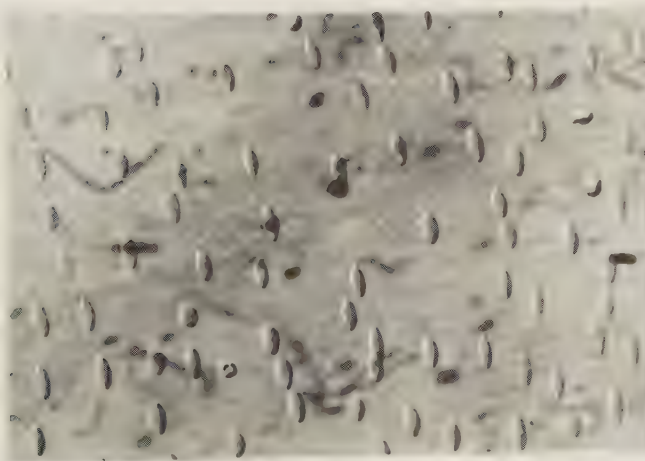


Abb. 10: Erythrozytensuspensionen bei Scherrate 184 sec^{-1}

a) Kontrollerythrozyten (Parpart₀)

b) 'super cells' (IPP₀)

c) 'super cells' nach 60 Minuten in Plasma (IPP₆₀)

d) 'super cells' nach 180 Minuten in Plasma (IPP₁₈₀)

Tab. 1: 2,3-DPG-Konzentrationen ($\mu\text{mol/ml}$ gepackte Erythrozyten) in den Kontrollerythrozyten (Parpart₀), 'super cells' (IPP₀) und in den 60 Minuten (IPP₆₀) und 180 Minuten (IPP₁₈₀) in autologem Plasma resuspendierten 'super cells'

Inku- bationsmed.	Versuch	I	II	III	IV	$\bar{x}$
Parpart ₀		3,77	4,34	4,57	4,81	4,37
IPP ₀		10,02	12,26	13,72	13,03	12,26
IPP ₆₀		9,81	12,50	14,09	13,13	12,38
IPP ₁₈₀		9,59	14,76	14,66	12,64	12,91

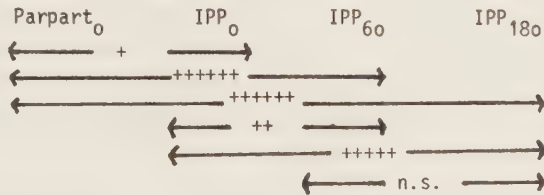
Tab. 2: Mittlere Erythrozytenverformung der Kontrollerythrozyten (Parpart₀), 'super cells' (IPP₀) und der 60 Minuten (IPP₆₀) und 180 Minuten (IPP₁₈₀) in autologem Plasma resuspendierten 'super cells' bei unterschiedlichen Schergraden

Umdrehungszahl (rpm)	10	20	30	60	90
Scherrate (sec^{-1})	28	54	77	184	282
Parpart ₀	.12	.23	.28	.38	.43
IPP ₀	.14	.18	.20	.29	.35
IPP ₆₀	.17	.22	.26	.33	.39
IPP ₁₈₀	.19	.23	.24	.35	.36

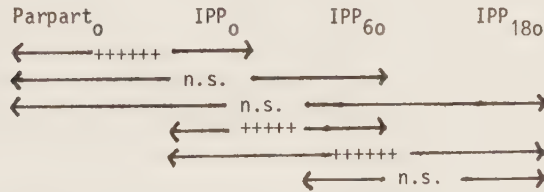
Tab. 3: Statistische Auswertung der Erythrozytenverformung -
Vergleich der Kontrollerythrozyten (Parpart₀), 'super cells'
(IPP₀) und der 60 (IPP₆₀) und 180 Minuten (IPP₁₈₀) in autologem
Plasma inkubierten 'super cells'

+ = 2 p < 0,05 ++++ = 2 p < 0,001
++ = 2 p < 0,02 +++++ = 2 p < 0,0001
+++ = 2 p < 0,01 ++++++ = 2 p < 0,00001

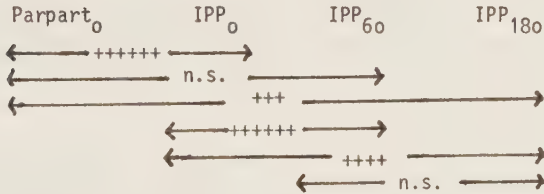
Scherrate 28



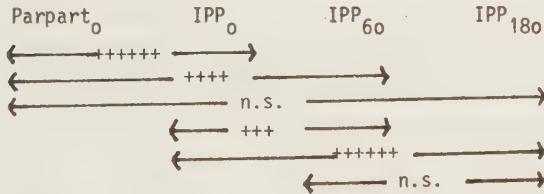
Scherrate 54



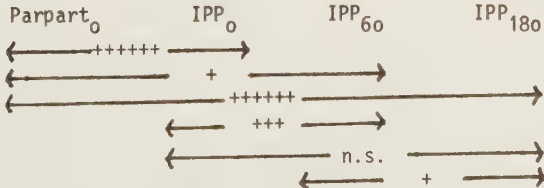
Scherrate 77



Scherrate 184



Scherrate 282



VII. LITERATUR

1. BAKKER, J.C.:
What is the clinical importance of alterations of the hemoglobin oxygen affinity in preserved blood-especially as produced by variations of red cell 2,3 DPG content?
Vox Sang. 34: 111 (1967)
2. BENESCH, R., BENESCH, R.E.:
The effect of organic phosphates from the human erythrocyte on the allosteric properties of hemoglobin.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 26: 162 (1967)
3. BUNN, H.F., BRIEHL, R.W.:
The interaction of 2,3-diphosphoglycerate with various human hemoglobins.
J. Clin. Invest. 49: 1088 (1970)
4. CHANUTIN, A., CURNISH, R.R.:
Effect of organic and inorganic phosphates on the oxygen equilibrium of human erythrocytes.
Arch. Biochem. Biophys. 121: 96 (1967)
5. DELIVORIA-PAPADOPOULOS, M., OSKI, F., GOTTLIEB, A.J.:
Oxygen-hemoglobin dissociation curves: Effect of inherited enzyme defects of the red cell.
Science 165: 601 (1969)
6. DITTRICH, H.:
Zur Methodik und Bedeutung des Hämatokritwertes im Zusammenhang anderer wichtiger diagnostischer Meßgrößen in der Chirurgie.
Langenbecks Arch. Chir. 302: 118 (1963)
7. DUHM, J.:
Effects of 2,3-DPG and other organic phosphate compounds on oxygen affinity and intracellular pH of human erythrocytes.
Pfluegers Arch. 326: 341 (1971)
8. DUHM, J.:
The effect of 2,3-DPG and other organic phosphates of the donnan equilibrium and the oxygen affinity of human blood.
In: Rorth, M., Astrup, P., Munksgaard, H.: Oxygen affinity of hemoglobin and red cell acid base status. pp. 585 (Copenhagen, 1972)

9. DUHM, J., GERLACH, E.:
Metabolism and function of 2,3-DPG in red blood cells, the human red cell in vitro.
In: Greenwalt, T.J., Jamieson, G.A. pp. 111 (Grune and Stratton Inc., 1974)
10. DUHM, J.:
Effects of high altitude (low arterial P_{O_2}) and of displacements of the oxygen dissociation curve of blood on peripheral O_2 extraction and P_{O_2} .
In: Brendel, W., Zink, R.A. (eds.) High altitude Physiology and Medicine-Topics in Environmental Physiology and Medicine (Springer: New-York, Heidelberg, Berlin, 1982)
11. EATON, J.W., BREWER, G.J.:
The relationship between red cell 2,3-DPG and levels of hemoglobin in the human.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 61: 756 (1968)
12. EVANS, E.A., LA CELLE, P.L.:
Intrinsic material properties of the erythrocyte membrane indicated by mechanical analysis of deformation.
Blood 45: 29 (1975)
13. FISCHER, T.M.:
Mechanisches Verhalten von Erythrozyten im Scherfeld zäher Lösungen.
Inaug.-Diss. Aachen 1978
14. GERSONDE, K., NICOLAU, C.:
Improvement of the red blood cell O_2 release capacity by lipid vesicle-mediated incorporation of inositol hexaphosphate.
Blut 39: 1 (1979)
15. GOSEN, v., J.:
Vergleichende Rheologie des Blutes: Speziesunterschiede in der Verformbarkeit und Aggregation der Erythrozyten.
Inaug.-Diss. München 1977
16. HARPER, H.A., LÖFFLER, G., PETRIDES, P.E., WEISS, L.:
Physiologische Chemie. pp. 736 (Springer Verlag, Berlin 1975)

17. HOCHMUTH, R.M., WORTHY, P.R., EVANS, E.A.:
Red cell extensional recovery and the determination of membrane viscosity.
Biophys. J. 26: 101 (1979)
18. KEITT, A.S., SALHANY, J.M., ELIOT, R.S.:
Super cells-metabolic and functional behavior of red cells with extreme elevation of 2,3-DPG.
Ann. Intern. Med. 74: 827 (1971)
19. KLEBER, S.M.:
Das rheologische Verhalten von 2,3-DPG-angereicherten Erythrozyten.
Inaug.-Diss. München 1982
20. KLOSE, H.J., KELSON, S., LINDERKAMP, O., RIEGEL, K., BETKE, K.:
Microrheology of young and old red cells in childhood iron deficiency and hemolytic anemias.
Bibl. Anat. 20: 178 (1981)
21. KLOSE, H.J.:
Die Verformbarkeit von Erythrozyten bei angeborenen und erworbenen Erkrankungen des Kindesalters.
Habilitationsschrift München 1983
22. LENFANT, C., JACOBS, P., ENGLISH, E., FINCH, G., REYNAFARJE, C., RAMOS, J., FAURA, J.:
Effect of altitude on oxygen binding by hemoglobin and on organic phosphate levels.
J. Clin. Invest. 47: 2652 (1968)
23. LINDERKAMP, O., ROTH, G., SENGESPEIK, C., VERSMOLD, H., RIEGEL, K.:
Blutvolumen, Serumeisen und Erythrozytenparameter von ausgetragenen, früh abgenabelten Säuglingen im ersten Lebensjahr.
Klin. Paediatr. 186: 511 (1974)
24. LINDERKAMP, O., MEISELMAN, H.J., WU, P.Y.K., MILLER, F.C.:
Blood and plasma viscosity and optimal hematocrit in the normal newborn infant.
Clin. Hemorheol. 1: 575 (1981)
25. LINDERKAMP, O., MEISELMAN, H.J.:
Geometric, osmotic and membrane mechanical properties of density-separated human red cells.
Blood 59: 1121 (1982)

26. LINDERKAMP, O., MEISELMAN, H.J., MILLER, F.C., WU, P.Y.K.:
Deformability, geometry and mechanical properties of normal neonatal red blood cells.
Pediatr. Res. 16: 208A (1982a)
27. LINDERKAMP, O., WU, P.Y.K., MEISELMAN, H.J.:
Deformability of density separated red blood cells in normal newborn infants and adults.
Pediatr. Res. 16: 964 (1982b)
28. LINDERKAMP, O., WU, P.Y.K., MEISELMAN, H.J.:
Geometry of neonatal and adult red blood cells.
Pediatr. Res. 17: 250 (1983)
29. MEISELMAN, H.J., EVANS, E.A., HOCHMUTH, R.M.:
Membrane mechanical properties of ATP-depleted human erythrocytes.
Blood 52: 499 (1978)
30. MEISELMAN, H.J.:
Morphological determinants of red cell deformability.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 41 (Suppl. 156): 27 (1981)
31. NASH, G.B., MEISELMAN, H.J.:
Cell and ghost viscoelasticity of hemoglobin concentration and in vivo ageing.
Biophys. J. 43: 63 (1983)
32. NASH, G.B., JONSON, C.S., MEISELMAN, H.J.:
Mechanical properties of oxygenated red blood cells in sickle cell (HbSS) disease.
Blood 63: 73 (1984)
33. OLBRICH, G.:
In vitro Experimente und in vivo Messungen der Hämoglobin-Sauerstoff-Transportfunktion bei Hämodilution.
Inaug.-Diss München 1974

34. OSKI, F.A., GOTTLIEB, A.J., DELIVORIA-PAPADOPOULOS, M.,
MILLER, W.W.:
Red cell 2,3-diphosphoglycerate levels in subjects with
chronic hypoxemia.
N. Engl. J. Med. 200: 1165 (1969)
35. OSKI, F.A., DELIVORIA-PAPADOPOULOS, M.:
The red cell, 2,3-diphosphoglycerate, and tissue oxygen
release.
J. Pediatr. 77: 941 (1970a)
36. OSKI, F.A., MILLER, W., DELIVORIA-PAPADOPOULOS, M.,
GOTTLIEB, A.J.:
The effects of deoxygenation of adult and fetal hemoglobin
on the synthesis of red cell 2,3-diphosphoglycerate and
its vivo consequences.
J. Clin. Invest. 49: 400 (1970b)
37. PARPART, A.K., LORENZ, P.B., PARPART, E.R., GREGG, J.R.,
CHASE, A.M.:
The osmotic resistance (fragility) of human red cells.
Clin. Invest. 26: 636 (1947)
38. PERUTZ, M.F.:
Stereochemistry of cooperative effects in hemoglobin.
Nature 228: 726 (1970)
39. ROSE, Z.B., LIEBOWITZ, J.:
Direct determination of 2,3-diphosphoglycerate.
Anal. Biochem. 35: 177 (1970)
40. ROSS, P.D., MINTON, A.P.:
Hard quasiphenical model for the viscosity of hemoglobin
solutions.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 76: 971 (1977)
41. SACHS, L.:
Angewandte Statistik. 5. Auflage
(Springer Verlag, Berlin 1978)

42. SAUER, F.:
Einführendes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Biologen. pp. 125, 147
(J.F. Lehmanns Verlag, München 1971)
43. SCHMID-SCHÖNBEIN, H., WELLS, R.E.:
Rheological properties of human erythrocytes and their influence upon the "anomalous" viscosity of blood.
Ergeb. Physiol. 63: 146 (1971)
44. SCHMID-SCHÖNBEIN, H., GOSEN, v.J., HEINRICH, L., KLOSE, H.J., VOLGER, E.:
A counter-rotating "rheoscope chamber" for the study of the microrheology of blood cell aggregation by microscopic observation and microphotometry.
Microvasc. Res. 6: 366 (1973)
45. SEIFERT, H.:
Fetales Hämoglobin und 2,3-Diphosphoglycerat als determinierende Faktoren der Sauerstoff-Transportfunktion des Blutes im ersten Lebensjahr.
Inaug.-Diss. München 1972
46. SEWCHAND, L.S., HAMPEL, W.L., DIADIE, K.R., MEISELMAN, H.J.:
Membrane mechanical properties of erythrocytes from patients with diabetic retinopathy.
Microcirculation 1: 361 (1982)
47. SIGMA:
2,3-diphosphoglyceric acid (2,3-DPG) in blood at 340 nm.
Technical Bulletin 35-UV: 2 (1980)
48. TILLMANN, W., WAGNER, D., SCHRÖTER, W.:
Verminderte Flexibilität der Erythrozyten von Neugeborenen.
Blut 34: 281 (1977)

49. TILLMANN, W., LAKOMEK, M., GAHR, M., HEIDEMANN, P.,
SCHRÖTER, W.:
Deformability of erythrocytes in juvenile diabetes:
The role of inorganic phosphate.
Pediatr. Res. 15: 1183 (1981a)
50. TILLMANN, W., ZABEL, U., LAKOMEK, M., SCHRÖTER, W.:
Influence of the fluidity of hemoglobin F on the
flexibility of red cells of newborn and older infants.
Bibl. Anat. 20: 222 (1981b)
51. TORRANCE, J., JACOBS, P., RESTREPO, A., ESCHBACH, J.,
LENFANT, C., FINCH, C.:
Intraerythrocytic adaptation to anemia.
N. Engl. J. Med. 283: 165 (1970a)
52. TORRANCE, J., BARTLETT, G.R.:
Altitude hypoxia and erythrocyte phosphates.
Biochem. Biophys. Acta 215: 409 (1970b)
53. VALERI, C.R., FORTIER, N.L.:
Red-cell 2,3-diphosphoglycerate and creatine levels in
patients with red-cell mass deficits or with cardio-
pulmonary insufficiency.
N. Engl. J. Med. 281: 1452 (1969)
54. VALTIS, D.J., KENNEDY, A.C.:
Defective gas-transport function of stored red-blood cells.
Lancet 1: 119 (1954)
55. VERSMOLD, H., WENNER, J., RIEGEL, K.:
Changes of blood oxygen affinity and capacity and red cell
2,3-diphosphoglycerate evoked by exchange transfusions with
ACD preserved blood in newborn infants: Their inter-
relationship and influences on oxygen supply of tissues and
erythropoiesis.
Z. Kinderheilkd. 113: 1 (1972)

56. VERSMOLD, H., SEIFERT, G., RIEGEL, K.P.:
Blood oxygen affinity in infancy: The interaction of fetal
and adult hemoglobin, oxygen capacity, and red cell
hydrogen ion and 2,3-diphosphoglycerate concentration.
Respir. Physiol. 18: 14 (1973)
57. WAUGH, R.E., LA CELLE, P.L.:
Abnormalities in the membrane material properties of
hereditary spherocytes.
Trans. Am. Soc. Mech. Eng. 102: 240 (1980)
58. WILLIAMS, A.R., MORRIS, D.R.:
The internal viscosity of the human erythrocyte may
determine its lifespan in vivo.
Scand. J. Haematol. 24: 57 (1980)
59. WOODSON, R.D., TORRANCE, J.D., SHAPPELL, S.D., LENFANT,
C.:
The effect of cardiac disease on hemoglobin-oxygen binding.
J. Clin. Invest. 49: 1349 (1970)
60. YIP, R., MOHANDAS, N., CLARK, M.R., JAIN, S., SHOHET, S.B.,
DALLMAN, P.R.:
Red cell membrane stiffness in iron deficiency.
Blood 62: 99 (1983)

D A N K S A G U N G

Herrn Prof. Dr. M. Jensen danke Ich für die Überlassung des Themas, die Betreuung und die Korrektur der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. H. Spiess und Herrn Prof. Dr. K. Betke danke Ich für die Arbeitsmöglichkeit in Ihren Kliniken.

Herrn Priv.-Doz. Dr. O. Linderkamp danke Ich für die wertvollen Anregungen und für die Arbeitsmöglichkeit in seinem Labor.

Frau Monika Güntner und Frau Ingeborg Hörth danke Ich besonders für die stets freundliche Unterstützung und nützlichen Hinweise bei der Durchführung der Arbeit.

LEBENS LAUF

Angaben zur Person

Name:	Elisabeth P. Z ü r n
Geboren:	2. 1. 1950 in 705 Waiblingen
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Eltern:	Paul Zürn und Elisabeth Zürn, geb. Wietschorke

Schul- und Berufsausbildung

1. 4.1956 - 21. 3.1964	Volksschule Neustadt
7. 4.1964 - 11. 3.1966	Zweijährige Handelsschule Fellbach
21. 9.1968 - 19. 4.1969	Sekretärinnenkurs Berufsbildungswerk des DGB, Stuttgart
2.10.1972 - 25. 6.1976	Städt. Abendgymnasium für Berufs- tätige, München
25. 6.1976	Allgemeine Hochschulreife
1.11.1977	Medizinstudium an der LMU München
13. 9.1979	Ärztliche Vorprüfung
15. 9.1980	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
22.12.1980	Beginn der experimentellen Arbeiten zur Promotionsarbeit
3. 9.1982	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
18.10.1982 - 18. 9.1983	Praktisches Jahr - Innere Medizin, 1. Med. Abt. der Universität München - Pädiatrie, Hauner'sches Kinderspital München - Chirurgie, Chirurgische Poliklinik der Universität München
12.10.1983	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
18.10.1983	Staatsexamen
26.10.1983	Approbation
2. 8.1984	Promotion

Berufstätigkeit

1. 4.1966 - 31.12.1974	Sekretärin in Stuttgart und München
1. 1.1984 - 31. 7.1984	Assistenzärztin der Inneren Medizin (Herz- und Kreislauferkrankungen)
1. 8.1984	Assistenzärztin der Gynäkologie

